

Avaliação da segurança não clínica da chalcona (E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Non-clinical safety assessment of chalcone (E) -1- (2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) -3- (4-nitrophenyl) prop-2-en-1-one in zebrafish (*Danio rerio*) adult

DOI:10.34117/bjdv6n8-125

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 12/08/2020

Joyce dos Reis Lima

Mestranda em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: joycereisl@hotmail.com

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira

Doutoranda em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE

Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: kueirislene.ferreira@aluno.uece.br

Antônio Wlisses da Silva

Doutorando em Biotecnologia de Recursos Naturais (RENORBIO-UECE)

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: wlissesda Silva@hotmail.com

Carlos Leone Alves Holanda

Licenciado em Química

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: carlos.leone@aluno.uece.br

Paulo Nogueira Bandeira

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Instituição: Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Endereço: Av. da Universidade, 850, CEP: 62.040-370

E-mail: bandeirapn@yahoo.com.br

Hélcio Silva dos Santos

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Instituição: Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Endereço: Av. da Universidade, 850, CEP: 62.040-370

E-mail: helciodossantos@gmail.com

Francisco Ernani Alves Magalhães

Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais pelo RENORBIO-UECE
Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903
E-mail: fernanimagalhaes@yahoo.com.br

Jane Eire Silva Alencar de Menezes

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)
Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903
E-mail: jane.menezes@uece.br

RESUMO

A avaliação da toxicidade de um produto químico, é essencial para identificar os parâmetros toxicológicos e suas relações dose-resposta, e assim elucidar os mecanismos de toxicidade e determinar a toxicodinâmica do composto químico. Chalconas são cetonas α,β -insaturadas. Foi avaliado a segurança não clínica da chalcona sintetizada (E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona (4-nitro). O zebrafish (*D. rerio*), que é muito usado predominantemente na biologia e na genética molecular, mostrou seu valor na toxicologia de compostos químicos, bem como na descoberta de novas drogas. O presente trabalho reporta o potencial toxicológico e atividade locomotora de uma chalcona sintética 4-nitro frente à zebrafish (*D. rerio*) adulto. Para o teste de campo aberto e avaliação da toxicidade, a amostra foi preparadas com DMSO 3% (0,1, 0,3 e 1 mg/mL; 20 μ L *i.p.*). Após 30 min. dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora (0-5 min) através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). No teste de toxicidade, foi calculada a concentração letal para matar 50% (CL₅₀) dos ZFa em até 96h. A chalcona não se mostrou tóxica. As três concentrações diminuíram a atividade locomotora (AL) dos ZFa (AL= 53,33% a 56%). Assim, sugere-se investigar outros testes farmacológicos de doenças que alteram o comportamento animal.

Palavras-chave: Atividade locomotora, Zebrafish, Chalconas.

ABSTRACT

The evaluation of the toxicity of a chemical product is essential to identify the toxicological parameters and their dose-response relationships, thus elucidating the mechanisms of toxicity and determining the toxicodynamics of the chemical compound. Chalcones are α,β -unsaturated ketones. The non-clinical safety of the chalcone synthesized (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl) prop-2-en-1-one (4-nitro). Zebrafish (*D. rerio*), which is widely used predominantly in biology and molecular genetics, has shown its value in the toxicology of chemical compounds, as well as in the discovery of new drugs. The present work reports the toxicological potential and locomotor activity of a synthetic 4-nitro chalcone against the adult zebrafish (*D. rerio*). For the open field test and toxicity assessment, the sample was prepared with 3% DMSO (0.1, 0.3 and 1 mg / mL; 20 μ L *i.p.*). After 30 min. of the treatments, the animals were added in glass Petri dishes (10 x 15 cm), containing the same water from the aquarium, marked with four quadrants and the locomotor activity (0-5 min) was analyzed by counting the number of lines (CL). In the toxicity test, the lethal concentration was calculated to kill 50% (LC₅₀) of ZFa in up to 96 hours. The chalcone was not toxic. The three concentrations decreased the locomotor activity (AL) of the ZFa (AL =

53.33% to 56%). Thus, it is suggested to investigate other pharmacological tests of diseases that alter animal behavior.

Keywords: Locomotor activity, Zebrafish, Chalcones

1 INTRODUÇÃO

A avaliação da toxicidade de um produto químico, é essencial para identificar os parâmetros toxicológicos e suas relações dose-resposta, e assim elucidar os mecanismos de toxicidade e determinar a toxicodinâmica do composto químico (ADRIAN *et al.*, 2005). Em um estudo realizado por Rihel *et al.* (2010), avaliaram o efeito de 3.968 compostos sobre a atividade locomotora em larvas de *zebrafish*, onde encontram características comportamentais específicas para muitas classes de psicotropicos. Estudos avaliando as respostas comportamentais em *zebrafish* já foram realizados com um grande numero de fármacos psicoativos. Neste estudo, avaliamos a atividade comportamental e toxicológica de uma chalcona sintetizada.

Chalconas são subclasses de flavonoides que possuem em suas estruturas dois anéis aromáticos unidos por um sistema cetônico α , β -insaturado. Elas atuam como precursores e intermediários na síntese de compostos ativos e na biossíntese de flavonóides (GAONKAR & VIGNESH, 2017). Possuem ampla variedade de propriedades farmacológicas, tais como, anti-HIV Cole *et al.* (2016) e anti-câncer (YADAV *et al.*, 2017). Esta vasta gama de atividades é em grande parte atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos das chalconas, pois a metodologia de síntese das mesmas, baseada na condensação de Claisen- Schmidt, possibilita a obtenção de uma grande variedade de compostos, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DUCKI *et al.*, 1998).

O *zebrafish* (*D. rerio*), que é muito usado predominantemente na biologia e na genética molecular, mostrou seu valor na toxicologia de compostos químicos, bem como na descoberta de novas drogas. Investigar a atividade de um composto sintético como alvo farmacológico, significa reduzir a quantidade de matéria vegetal sem comprometer a natureza e contribuir com a busca de novos fármacos que não tenha efeitos colaterais. Acrescenta a isto, o uso de pouco material a ser testado uma vez que se utiliza o *zebrafish* como modelo animal quando comparado com roedores.

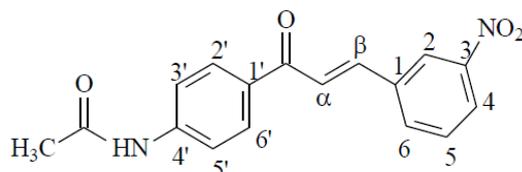
Portanto, o presente trabalho reporta o potencial toxicológico e atividade locomotora de uma chalcona sintética (E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1- ona frente à *zebrafish* (*D. rerio*) adulto.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

A chalcona (E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona (4-nitro) (Fig. 1) foi sintetizada através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico, utilizando *p*-aminoacetofenona e *m*-nitrobenzaldeído segundo metodologia de Gasull *et al.*, (2000) seguida da reação de acetilação com anidrido acético em meio tamponado (ácido acético/acetato de sódio) em pH =5, sob agitação magnética.

Figura 1: Estrutura química da chalcona (E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona (4-nitro).



2.2 ANIMAIS

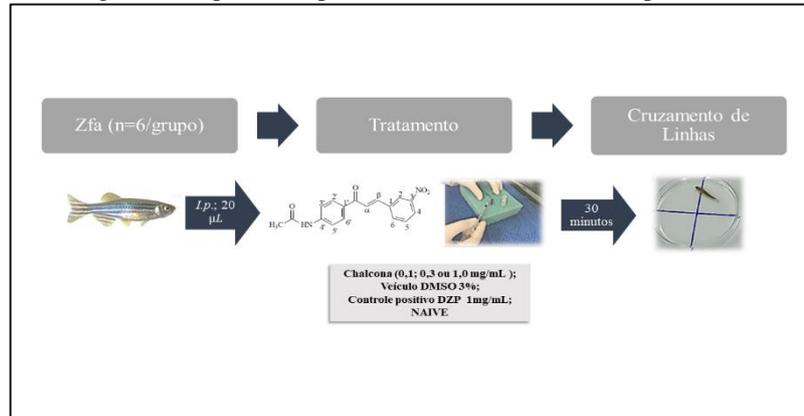
Zebrafish adulto (*Danio rerio*) (Zfa), do tipo selvagem, de ambos os sexos e com idades entre 60 e 90 dias, medindo $3,5 \pm 0,5$ cm de comprimento e pesando $0,4 \pm 0,1$ g foram obtidos de um comércio local (Fortaleza, Brasil). Os animais foram aclimatados por 24 horas em aquários de vidro ($30 \times 15 \times 20$ cm) contendo água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25°C e pH 7,0, com ciclo circadiano de 14:10 h claro / escuro. Os peixes receberam alimentação ad libitum 24 h antes das experiências. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada ($2-4^\circ\text{C}$) por 10 minutos até a perda de movimentos operculares. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso animal da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE, # 7210149 /2016).

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os animais ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados com a chalcona 4 – nitro (0,1; 0,3 ou 1 mg/mL) ou veículo (DMSO 3% ou e DZP 1mg/mL; 20 μL ; *i.p.*). A atividade locomotora foi avaliada pelo teste de campo aberto para identificar alterações na coordenação motora do peixe-zebra por sedação e / ou relaxamento muscular (AHMAD & RICHARDSON, 2013). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 30 min. dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora (0-5 minutos) através da contagem do número de cruzamento de

linhas (CL). O valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%) e foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente.

Figura 2: Esquema do procedimento do teste de Campo aberto.



Elaborado pelo autor

2.4 TOXICIDADE AGUDA EM ZEBRAFISH

Os ZFa (n=7/grupo) foram tratados via intraperitoneal (*i.p*) com 20 µL do composto dissolvido em DMSO 3% (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/mL). Como controle negativo foi utilizado o veículo (DMSO 3%; 20 µL *i.p*). Após 24, 48, 72 e 96 horas, os peixes mortos em cada grupo foram contados e a concentração letal (CL₅₀) foi determinada (ARELLANO-AGUIAR *et al.*, 2015).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média para cada grupo analisado. Após confirmação da distribuição normal e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA one-way), seguida pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o GraphPad Prism v. 5.01. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% (P <0,05).

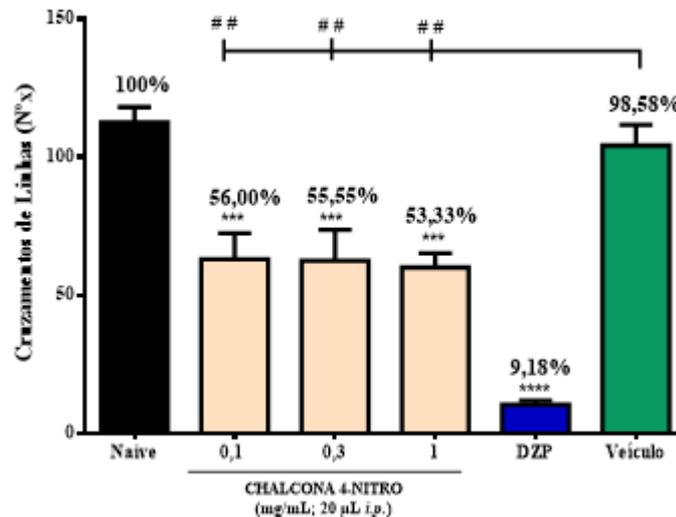
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental que vem sendo utilizado para avaliar a ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish (*D. rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ou não (TAYLOR *et al.*, 2017). Assim, os efeitos da chalcona 4-nitro na locomotora atividade do zebrafish adulto foram avaliados.

De acordo com resultados da Figura 1, as três concentrações 0,1; 0,3 e 1 mg/mL da chalcona sintética diminuíram a atividade locomotora dos Zfa (%AL= 53,33% a 56%). Esses resultados

mostram que a chalcona causou efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais, significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao efeito sedativo do diazepam (DZP; 1 mg/kg; $p < 0,0001$ vs. naïve e veículo).

Figura 1. Efeito da chalcona sintética sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min).



Fonte: Elaborado pelo autor

As alterações fisiológicas do sistema nervoso central (SNC), provenientes de privações sensoriais de origem olfatória e visual, alterações na neurogênese e na concentração de neurotransmissores são correlacionáveis a alterações comportamentais. Parâmetros simples de locomoção de larvas de *zebrafish* são um dos mais comuns indicadores utilizados na literatura científica que contribuem no efeito de agentes tóxicos e estabelecimento de modelos farmacológicos (BICHARA *et al.*, 2014).

Portanto, a identificação dos efeitos comportamentais induzidos por diferentes classes de substâncias psicoativas em larvas de *zebrafish* e em animais adultos pode contribuir para o processo de desenvolvimento de novos fármacos e na elucidação de mecanismos de ação e também como um modelo para avaliar neurotoxicidade. Assim, avaliamos a toxicidade da chalcona 4-nitro utilizando *zebrafish* adulto.

Tabela 1. Resultados dos testes de toxicidade aguda da chalcona sintética frente ao zebrafish adulto.

Amostra	Mortalidades				CL ₅₀ (mg/mL) / IV
	CN	C1	C2	C3	
4-NITRO	0	0	0	0	> 1

CN- Grupo controle negativo: DMOS 3%; Chalcona (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) -3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-ona; C1 – Concentração 1 (1 mg/mL; 20 µL; *i.p.*); C2 – Concentração 2 (3 mg/mL; 20 µL; *i.p.*); C3 – Dose 3 (10 mg/mL; 20 µL; *i.p.*); DL₅₀- Dose letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como resultado, constatou-se que todas as concentrações da chalcona não causaram mortalidade de 50% dos zebrafish adultos (CL₅₀ > 1 mg/mL), como mostra a Tabela 1. Recentemente, um estudo também avaliou a toxicidade de um composto denominado endosulfan residual porém com embriões de Zebrafish (Gabriela Godinho Mello et al., 2020)

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que a chalcona (E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona alterou a locomoção do Zfa e aparentemente é segura, pois não foi tóxica frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto até 96 h de análise. Assim, sugere-se investigar outros testes farmacológicos de doenças que alteram o comportamento animal.

REFERÊNCIAS

ADRIAN J. HILL, HIROKI TERAOKA, WARREN HEIDEMAN, RICHARD E. PETERSON; Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, v. 86, 2005.

BUKHARI, S.N.A.; FRANZBLAU, S.G.; JANTAN, I.; JASAMAI, M. Current prospects of synthetic curcumin analogs and chalcone derivatives against mycobacterium tuberculosis. *Medicinal Chemistry*, v. 9, 2013.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf. Acesso em 22/4/19.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, v. 78, 2013.

DEWIK, P.M. Medical Natural Product, Dohn willy and Sons, West Sussex, England, 1998.
COLE, A.L.; HOSSAIN, S.; COLE, A.M.; PHANSTIEL, O. Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 24, 2016.

DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J.A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N.J.; MCGOWN, A.T.; RENNISON, D. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 8, 1998.

GAONKAR, S.L.; VIGNESH, U.N. Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. *Research on Chemical Intermediates*, v.43, 2017.

GEBAUER, D.L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A.L.; SCHAEFER, I.C.; BONAN, C.D.; LARA, D.R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 99, 2011.

MAGALHÃES, F.E.A.; DE SOUSA, C.A.P.B.; SANTOS, S.A.A.R.; MENEZES, R.B.; BATISTA, F.L.A.; ABREU, A.O.; DE OLIVEIRA, M.V.; MOURA, L.F.W.G.; RAPOSO, R.S.; CAMPOS, A.R. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish*, v. 4, n.5, 2017.

TAYLOR, J.C.; DEWBERRY, L.S.; TOTSCH, S.K.; YESSICK, L.R.; DEBERRY, J.J.; WATTS, S.A.; SORGE, R.E.; A novel zebrafish-based model of nociception. *Physiology & Behavior*, v. 174, 2017.

YADAV, P.; LAL, K.; KUMAR, A.; GURU,S.K.; JAGLAN, S.; BHUSHAN, S. Green synthesis and anticancer potential of chalcone linked-1,2,3-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 126, 2017.